

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Deskripsi Tanaman Pohpohan (*Pilea trinervia* Wight)

Menurut Siemonsma dan Piluek (1994), pohpohan merupakan tanaman terna yang tumbuh tegak hingga mencapai 2 m dan termasuk dalam suku Urticaceae. Pohpohan diketahui berasal dari daerah Himalaya tropis bagian timur dan Jawa. Penyebaran untuk tanaman ini cukup luas, yaitu dari India dan Srilangka hingga Taiwan, Jepang, Filipina dan Indonesia.

Popohan dapat tumbuh subur di daerah pegunungan, khususnya di daerah Jawa Barat pada ketinggian 500-2700 m di atas permukaan laut. Pohpohan tumbuh di daerah lembab, baik yang mengandung sedikit atau banyak humus, di hutan-hutang dan di pinggir-pinggir jalan. Pohpohan dapat dibiakkan menggunakan biji (Oschse, 1980).

Pohpohan memiliki ukuran daun 6-20 cm x 2-10 cm, dan tangkai daunnya memiliki panjang 1-5 cm. Helaiian daun berbentuk bulat meruncing (*oblong-lanceolate*) atau berbentuk elips, tepi daun bergerigi (*serrate*) dengan dasar daun tumpul dan ujungnya runcing, dan pertulangan daun melengkung (van Steenis, 2010). Bentuk daun pohpohan dapat dilihat pada Gambar 1.

Kedudukan bunga pada tangkai (*infloresensce*) pada 5-30 cm, dengan tangkai bunga lebih panjang daripada tangkai daun. Pohpohan memiliki bunga tidak sempurna (terdiri dari bunga jantan dan betina) biasanya bunga betina berada di bawah bunga jantan, berwarna putih atau hijau keputihan, dengan benang sari sebanyak kepala putik (Siemonsma dan Piluek, 1994).



Gambar 1. Tanaman Pohpohan (Dokumentasi Pribadi)
Keterangan: A. Daun pohpohan yang dijadikan eksplan; B. Batang pohpohan.

Kedudukan taksonomi pohpohan menurut Lin (2009):

Kerajaan : Plantae
Divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonas
Bangsa : Urticales
Suku : Urticaceae
Marga : *Pilea*
Jenis : *Pilea trinervia* Wight

Menurut Ochse (1980), daun pohpohan sering dikonsumsi masyarakat sebagai lalapan, karena daunnya sangat lunak dan memiliki aroma yang khas atau berbau harum yang disukai. Daun muda dari pucuk pohpohan merupakan bagian utama yang dikonsumsi. Pohpohan juga sering ditanam sebagai tanaman pagar atau ornamental.

B. Kandungan Kimia Pohpohan

Pohpohan sebagai obat herbal yang memiliki khasiat tentu mengandung senyawa kimia. Menurut Amalia dkk. (2006), daun pohpohan yang diekstrak menggunakan n-heksana, etil asetat dan etanol mengandung flavonoida, alkaloida dan steroida atau triterpenoida. Menurut Desmiati (2001), daun segar pohpohan mengandung asam askorbat, senyawa fenol, α -tokoferol, dan β -karoten yang berfungsi sebagai antioksidan.

1. Flavonoida

Menurut Marston dan Hostettman (2006), senyawa flavonoida memiliki ikatan glikosida yang dapat didegradasi oleh aktivitas enzim yang didapatkan dari bahan tanaman baik dalam keadaan segar maupun kering. Ekstraksi senyawa flavonoida membutuhkan pelarut yang sesuai dengan sifat kepolarannya. Beberapa jenis flavonoida bersifat kurang polar, sedangkan flavonoida glikosida dan aglikon bersifat lebih polar.

Pigmen flavonoida menurut strukturnya merupakan turunan senyawa induk flavon berupa tepung putih yang terdapat pada tumbuhan, dan semuanya memiliki sejumlah sifat yang sama. Saat ini dikenal ada sekitar sepuluh kelas flavonoida, yaitu antosianin, proantosianidin, flavonol, flavon, glikoflavon, biflavonil, khalkon dan auron, flavanon, dan isoflavon (Harborne, 1987).

2. Alkaloida

Menurut Harborne (1987), ada sekitar 5500 jenis alkaloida telah diketahui, alkaloida merupakan golongan zat metabolit sekunder yang

terbesar. Pada umumnya alkaloida mencakup senyawa yang bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya gabungan, sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloida seringkali beracun bagi manusia dan banyak memiliki kegiatan fisiologis yang menonjol, sehingga alkaloida digunakan secara luas di bidang pengobatan. Alkaloida biasanya bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan pada suhu kamar.

Pada tanaman, alkaloida biasanya berfungsi sebagai salah satu pertahanan diri baik terhadap herbivora maupun predator. Beberapa alkaloida dapat bersifat antibakteri, antifungi, dan antivirus. Alkaloida sendiri dapat menjadi herbisida bagi tanaman lain untuk mengurangi tingkat persaingan yang terjadi (Wink, 2008).

3. Triterpenoida

Triterpenoida adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik, yaitu skualena. Senyawa ini berbentuk kristal sering kali memiliki titik lebur yang tinggi dan bersifat aktif optik. Triterpenoida dapat dibedakan menjadi empat golongan senyawa, yaitu: triterpena, steroid, saponin, dan glikosida jantung (Harborne, 1987).

Secara umum, usaha untuk peningkatan produksi metabolit sekunder yang diproduksi menggunakan teknik KJT adalah dengan penambahan enzim yang dibutuhkan oleh sel untuk menghasilkan metabolit sekunder tertentu. Usaha lain yang dapat dilakukan adalah mengoptimaslisasi medium yang

digunakan, serta dapat juga dengan optimalisasi penggunaan ZPT maupun *bioregulator* (Becker dan Sauerwen, 1990). Menurut Zakiah dkk., (2003), salah satu metode pendekatan untuk peningkatan produksi metabolit sekunder dengan penambahan prazat. Penambahan prazat ke dalam medium dapat merangsang aktivitas enzim tertentu yang terlibat dalam jalur biosintesis, sehingga meningkatkan produksi metabolit sekunder.

C. Kultur Jaringan Tanaman (KJT)

Teknik KJT semula ditujukan untuk penelitian dasar di bidang biologi, terutama untuk pembuktian totipotensi sel. Sekarang teknik KJT ini sudah berkembang dengan pesat dan dipergunakan untuk berbagai keperluan lain terutama di bidang agrobisnis dan farmasi. Pada bidang agrobisnis aplikasi teknik KJT dapat menekan biaya produksi yang cukup besar khususnya dalam bidang produksi bibit, bibit yang diproduksi dalam jumlah besar dan dengan waktu yang relatif singkat, tidak memerlukan lahan yang luas, tidak bergantung pada iklim, dan bebas hama dan penyakit, sehingga dapat didistribusikan melewati batas-batas negara tanpa harus melalui prosedur karantina (Nurheti, 2010).

Menurut Nurheti (2010), teori dasar dari kultur jaringan adalah : sel dari suatu organisme multiseluler, di mana pun letaknya, sebenarnya sama dengan sel zigot karena berasal dari satu sel. Setiap sel berasal dari satu sel. Teori totipotensi sel artinya, setiap sel memiliki potensi genetik seperti zigot, yaitu mampu memperbanyak diri dan berdiferensiasi menjadi tanaman lengkap.

Teknik KJT dapat berhasil bila syarat-syarat yang diperlukan terpenuhi, yaitu meliputi pemilihan eksplan, penggunaan medium yang cocok, keadaan yang aseptik dan pengaturan udara yang baik, terutama untuk kultur cair. Pada prinsipnya semua jenis sel dapat ditumbuhkan, pemilihan bagian tanaman yang masih muda dan mudah tumbuh, yaitu meristem, misalnya daun muda, ujung batang, keping biji dan lainnya (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

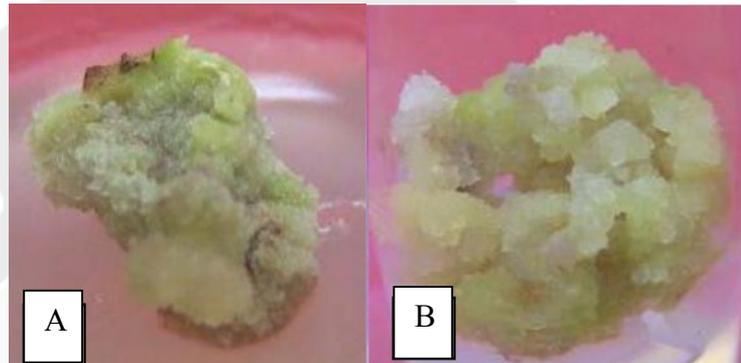
a. Eksplan

Eksplan adalah bagian tanaman yang dijadikan inokulum awal yang ditanam dalam medium, yang akan menunjukkan pertumbuhan perkembangan tertentu (Gunawan, 1987). Menurut George dan Sherrington (1984), ukuran eksplan sangat berpengaruh terhadap keberhasilan eksplan *in vitro*. Apabila ukuran potongan eksplan terlalu kecil menyebabkan ketahanan eksplan yang kurang baik dalam kultur, sebaliknya apabila terlalu besar eksplan akan mudah terkontaminasi oleh mikroorganisme.

b. Kalus

Salah satu indikator keberhasilan dalam teknik KJT adalah terbentuknya kalus dari eksplan yang dinkubasi ke dalam medium. Kalus adalah proliferasi masa jaringan yang belum terdiferensiasi. Masa sel ini terbentuk di seluruh permukaan irisan eksplan sehingga semakin luas permukaan irisan semakin banyak kalus yang terbentuk (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Terbentuknya kalus pada bagian eksplan yang terluka disebabkan oleh otolisis sel, dan dari sel yang rusak tersebut akan dihasilkan senyawa-senyawa yang akan merangsang pembelahan sel pada lapisan berikutnya (Gunawan 1992).

Menurut Sudirga (2002), terbentuknya kalus disebabkan adanya penambahan zat pengatur eksogen



Gambar 2. Bentuk dan tekstur kalus dari eksplan daun Ramin (*Gonystylus bambamus* (Miq) Kurz.) (Yelnititis, 2012)

Keterangan: A. Kalus bertekstur kompak; B. Kalus bertekstur meremah

Secara morfologi, kalus yang terbentuk memiliki beberapa tekstur dan warna tertentu. Menurut Pierik (1987), perbedaan tekstur kalus tergantung jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi yang terdapat dalam medium, ZPT dan kondisi lingkungan kultur. Secara tekstur kalus dibedakan antara kalus yang berstruktur *friable* (Gambar 2b) dan *non-friable* (Gambar 2a). Kalus dengan struktur remah (*friable*) merupakan kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang mudah terlepas (Gambar 2b) sedangkan kalus kompak (*non-friable*) terdiri dari sekumpulan sel yang kuat (Gambar 2a) (Syahid, 2008). Kondisi warna kalus dapat bervariasi, hal ini disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sumber eksplan (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

D. Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi adalah proses untuk mematikan atau menonaktifkan spora mikroorganisme sampai ke tingkat yang tidak memungkinkan lagi berkembang biak atau menjadi sumber kontaminan selama proses perkembangan berlangsung (Sandra dan karyaningsih, 2000). Sterilisasi menjadi salah satu tahapan penting dalam teknik KJT. Setiap tanaman memiliki tingkat kontaminasi dan penanganan yang berbeda. Menurut Gunawan (1992), penanganan kontaminasi pada eksplan dilakukan tergantung pada kondisi fisiologis tanaman dan lingkungannya.

Menurut Santoso dan Nursandi (2002), sumber kontaminan tidak hanya berada pada bagian permukaan saja tetapi juga berada pada bagian dalam eksplan. Biasanya mikrobial yang terdapat pada permukaan akan lebih cepat berkembang biak, sedangkan yang berada di bagian dalam akan membutuhkan waktu yang lebih lama.

Sterilisasi eksplan dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu secara mekanik dan kimia. Sterilisasi secara mekanik dapat dilakukan dengan membakar eksplan di atas lampu spiritus sebanyak tiga kali. Sterilisasi secara mekanik hanya dilakukan untuk eksplan yang keras atau berdaging. Sterilisasi secara kimia ialah sterilisasi menggunakan bahan kimia dengan cara direndam. Sterilisasi secara kimia digunakan untuk eksplan yang lunak (jaringan muda) seperti daun, tangkai daun, anther, dan sebagainya. Bahan-bahan kimia yang

dapat dan biasanya digunakan adalah natrium hipoklorit, merkuri klorit, dan alkohol 70% (Tabel 1) (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Tabel 1. Bahan kimia yang Umum Digunakan untuk Bahan Sterilan

Desinfektan	Konsentrasi	Waktu Perlakuan (Menit)
Benzalkonium klorida	0,01-0,1%	5-20
Larutan Bromin	1-2%	2-10
Kalsium Hipoklorit	9-10%	5-30
Etil Alkohol	75-95%	Beberapa detik-beberapa menit
Hidrogen Peroksida	3-12%	5-15
Merkuri Klorida	0,1-1,0%	2-10
Perak Nitrat	1%	5-30
Sodium Hipoklorit	0,5-5%	5-30

Sumber: Razdan (2002).

E. Medium Kultur Jaringan Tanaman

Razdan (2002) menyatakan, pertumbuhan dan morfogenesis dari jaringan tumbuhan secara *in vitro* diatur oleh komposisi medium kultur. Pada dasarnya nutrisi yang dibutuhkan oleh setiap tumbuhan sama, namun untuk memperoleh pertumbuhan yang optimum dalam kondisi laboratorium dapat berbeda untuk beberapa spesies. Komponen utama dalam medium kultur jaringan tumbuhan adalah nutrisi organik (makro dan mikro nutrisi), sumber karbon, suplemen organik, zat pengatur tumbuh dan agen pematid (medium padat).

Ada 6 unsur utama makronutrien yang dibutuhkan oleh tumbuhan dalam jumlah banyak, yaitu nitrogen (N), fosfor (P), kalium (K), kalsium (Ca), magnesium (Mg) dan Sulfur (S) (Razdan, 2002). Mikronutrien yang dibutuhkan oleh tumbuhan dalam jumlah sedikit namun penting adalah besi

(Fe), nikel (Ni), mangan (Mn), klorin (Cl), seng (Zn), boron (B), tembaga (Cu), molibdat (Mo), kobalt (Co), aluminium (Al), iodine (I) dan natrium (Na) (George dan de Klerk, 2008).

Menurut Razdan (2002), sumber karbon yang paling disarankan dalam kultur jaringan tanaman adalah sukrosa. Penambahan sumber karbon ini akan mempercepat proliferasi sel dan regenerasi tunas. Selain sumber karbon, vitamin dan asam amino juga dibutuhkan untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik dari suatu kultur jaringan tanaman. Macam vitamin yang sering digunakan adalah *thiamine* (B₁), *nicotinic acid* (B₃), kalsium pantotenat (B₅), *pyridoxine* (B₆), dan *myoinositol*.

Medium *Murashige and Skoog* (MS) merupakan medium yang mengandung komposisi garam yang lengkap dan dapat digunakan untuk hampir semua jenis kultur (Razdan, 2002).

F. Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Menurut Narayanaswamy (1994), zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan zat adiktif yang ditambahkan ke dalam medium untuk membantu pertumbuhan kultur. Zat pengatur tumbuh adalah molekul-molekul yang kegiatannya mengatur reaksi-reaksi metabolik penting. ZPT mencakup hormon tumbuhan (alami) dan senyawa-senyawa buatan yang dapat mengubah tumbuh dan perkembangan tumbuhan (Suwarsono, 1986). Terdapat beberapa kelas dari ZPT yang digunakan, yaitu auksin, sitokinin, giberelin, etilen, dan asam absisat (Machakova dkk., 2008).

Zat pengatur tumbuh yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah asam 2,4 diklorofenoksiasetat atau yang lebih dikenal dengan 2,4 D. Menurut Sandra (2013), auksin berasal dari bahasa Yunani yang artinya tumbuh. Auksin merupakan zat pengatur tumbuh yang mampu berperan menginduksi terjadinya kalus. Selain itu, auksin juga berperan mendorong proses morfogenesis kalus.

2,4 D merupakan golongan auksin sintetis yang sifatnya stabil karena tidak mudah terurai oleh enzim yang dihasilkan oleh sel ataupun pemanasan. ZPT 2,4 D sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus embrionik dan paling efektif dalam memacu pembentukan kalus (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Konsentrasi penggunaan 2,4 D harus diperhatikan sebab dalam konsentrasi rendah akan menginduksi kalus, namun pada konsentrasi tinggi akan menyebabkan mutasi karena 2,4 D bersifat herbisida (Goldsworthy dan Mina, 1991). Penambahan 2,4 D dalam medium akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan senyawa kimia alami flavonoid (Rahayu dkk., 2003).

Selain penggunaan auksin penggunaan sitokinin dalam pembentukan kalus juga sangat penting. Sitokinin berfungsi dalam stimulasi pembelahan sel, proliferasi kalus, dan pembentukan tunas, memacu proliferasi meristem ujung, menghambat pertumbuhan akar, serta mendorong pembentukan klorofil pada kalus (Santoso dan Nursandi, 2002). Kinetin adalah ZPT sitokinin yang memiliki kemampuan untuk menginduksi pembelahan sel. Kinetin sering

digunakan pada kultur suspensi sel dan jaringan tanaman untuk menginduksi kalus dan untuk menumbuhkan tunas dari kalus (Duszka dkk., 2009).

Wattimena dkk. (1992) menyatakan, kecepatan sel membelah dapat dipengaruhi oleh adanya kombinasi auksin-sitokinin tertentu dalam konsentrasi tertentu tergantung pada tanamannya, juga faktor-faktor luar seperti cahaya dan temperatur. Selain auksin, sitokinin juga berfungsi untuk menstimulasi pembelahan sel pada masa pro-embriogenik sel, sehingga keduanya dibutuhkan untuk inisiasi kalus embrionik (Jimnez dan Bangerth, 2001).

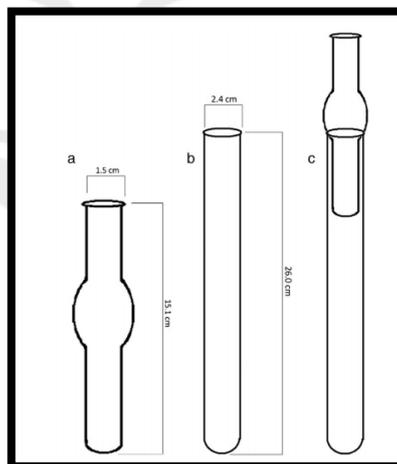
G. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa terlarut ke dalam pelarut. Senyawa yang bersifat anorganik atau senyawa polar dapat terlarut oleh senyawa polar, sedangkan senyawa organik atau nonpolar dapat terlarut oleh pelarut nonpolar (Pecsok dkk., 1976). Ekstraksi yang tepat bergantung pada tekstur dan kandungan air dari bahan tumbuhan yang akan diekstraksi dan jenis senyawa yang akan diisolasi. Umumnya sebelum dilakukan ekstraksi, pencegahan akan oksidasi maupun hidrolisis senyawa dalam tumbuhan perlu dilakukan dengan cara pengeringan atau perendaman ke dalam etanol mendidih (Harborne, 1987).

Metode ekstraksi dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu ekstraksi sederhana dan ekstraksi khusus. Ekstraksi sederhana terdiri dari maserasi, perkolasi, reperkolasi, evakolasi dan dialokasi. Ekstraksi khusus terdiri dari sokletasi, arus balik, dan ultrasonik (Harborne, 1987).

Refluks merupakan metode ekstraksi yang dilakukan dengan merendam materi tumbuhan menggunakan pelarut tertentu dalam labu bulat yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut kemudian dipanaskan hingga mencapai titik didih dan uap akan terkondensasi sehingga pelarut akan kembali ke labu ekstraksi. Kelemahan dari metode ini adalah senyawa yang sensitif dengan suhu tinggi dapat terdegradasi (Seidel, 2006).

Cold finger merupakan metode modifikasi dari metode refluks yang bertujuan untuk mengekstraksi suatu materi tumbuhan dalam skala yang kecil. Metode ini menggunakan sebuah tabung gelas yang berbentuk jari, yang diletakkan di atas tabung penyari selama proses penyarian dengan pemanasan. Tabung *cold finger* diisi air dengan tujuan untuk mendinginkan bagian atas dari tabung penyari sehingga uap pelarut terkondensasi dan menjaga senyawa volatil tidak hilang akibat penguapan (Ferreira dkk., 2013).



Gambar 3. Skema Tabung *Cold Finger* (Ferreira dkk., 2013)
Keterangan: a. Tabung *Cold Finger*; b. Tabung Penyari;
c. Penggambaran Metode *Cold Finger*

H. Kromatografi Lapis Tipis

Sesuai dengan definisi Keulemans, kromatografi adalah suatu metode pemisahan fisik dimana komponen-komponen yang dipisahkan didistribusikan di antara dua fase, salah satu fase tersebut adalah suatu lapisan stasioner dengan permukaan yang luas, yang lainnya sebagai fluida yang mengalir lembut sepanjang landasan stasioner (Day dan Underwood, 2002). Metode kromatografi sangat beragam yang dapat dilakukan, namun dalam menganalisis senyawa fitokimia pada tumbuhan metode kromatografi yang banyak dipakai, murah dan dapat dilakukan dalam waktu yang singkat adalah kromatografi lapis tipis (*Thin Layer Chromatography*).

Kromatografi lapis tipis merupakan salah satu analisis kualitatif dari suatu sampel yang ingin dideteksi dengan memisahkan komponen-komponen sampel berdasarkan perbedaan kepolaran. Prinsip kerjanya memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Teknik ini biasanya menggunakan fase diam dari bentuk plat silika dan fase geraknya disesuaikan dengan jenis sampel yang ingin dipisahkan. Larutan atau campuran larutan yang digunakan dinamakan eluen (Skoog dkk., 1996).

Menurut Abdul (2007), kromatografi Lapis Tipis (KLT) dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1938. KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembangan akan bergerak sepanjang fase diam

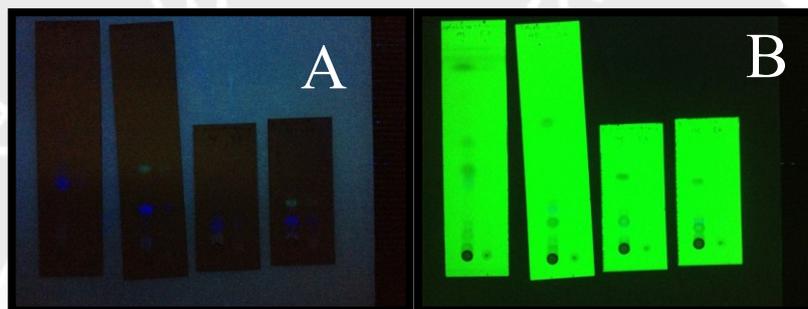
karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*).

Beberapa keuntungan dari kromatografi lapis tipis adalah dalam pelaksanaannya lebih mudah dan murah daripada kromatografi kolom. Demikian juga dengan peralatan yang digunakan lebih sederhana dan dapat dikatakan bahwa hampir semua laboratorium dapat melaksanakannya secara cepat setiap saat. Keuntungan lainnya adalah banyak digunakan untuk analisis, dapat dilakukan elusi secara *ascending* maupun *descending*, ketepatan penentuan kadar lebih baik karena komponen yang ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak, dan identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau radiasi sinar UV (Abdul, 2007).

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penyerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μ m. Penyerap yang paling sering digunakan adalah silika dan serbuk selulosa. Lempeng KLT disiapkan dengan melapiskan penyerap ke permukaan kaca, gelas, atau aluminium dengan ketebalan 250 μ m. Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dengan metode *Trial and error* karena waktu yang dibutuhkan hanya sebentar. Sistem yang paling sederhana ialah campuran dua pelarut organik, karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal (Abdul, 2007).

Bila menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Setelah penotolan, tahap selanjutnya adalah elusi, yaitu

mengembangkan sampel tersebut dalam suatu bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan upa fase gerak. Tepi bagian bawah lempeng lapis tipis yang telah ditotoli sampel dicelupkan ke dalam fase gerak kurang lebih 0,5-1 cm. Selama proses elusi, bejana kromatografi harus ditutup rapat (Abdul, 2007).



Gambar 4. Contoh Hasil Pemisahan Senyawa Kimia Menggunakan Metode KLT (Dokumentasi pribadi, 2012)

Keterangan: A. Panjang Gelombang 365 nm; B. Panjang Gelombang 254 nm; gambar diambil di Laboratorium Instrumentasi PT. Deltomed Laboratories

Pemisahan komponen dengan KLT dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain suhu ruang, kejenuhan uap pereaksi, ketebalan fase diam, dan cara penetesan contoh ekstrak. Kromatografi adsorpsi umumnya lebih mudah dilaksanakan karena polaritas adsorbennya tetap, sehingga pemisahan dapat dilaksanakan dengan memanipulasi polaritas pelarutnya (Adnan, 1997).

I. Hipotesis

1. Daun pohpohan dapat disterilisasi menggunakan metode yang dilakukan oleh Astuti (2004).
2. Kalus terbaik dihasilkan dari kombinasi ZPT, yaitu 1 ppm 2,4 D dan 0,1 ppm Kinetin.

3. Kalus daun pohpohan mengandung metabolit sekunder, yaitu alkaloida, flavonoida, dan steroida atau triterpenoida.

